

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 février 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/09288 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>2</sup>: C12N 5/06, (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02173

(22) Date de dépôt international: 28 juillet 2000 (28.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/AZ09836 29 juillet 1999 (29.07.1999) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US): CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE [FR/FR]; 191, avenue du Doyen Gaston Giraud, F-34000 Montpellier (FR). CELLGEN SARL [FR/FR]; 314, rue du Mas du Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): KLEIN, Bernard [FR/FR]; 83, allée des Ecuries, F-34980 Saint Clément de Rivièrel (FR). TARTE, Karin [FR/FR]; Terrasses de l'Oliveraie - B213, Rue E. Brany, F-34790 Grabels (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publié:

— Avec rapport de recherche internationale.

— Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Titre: METHOD FOR OBTAINING DENDRITIC CELLS, RESULTING DENDRITIC CELLS AND USES THEREOF FOR CLINICAL PURPOSES

(54) Titre: PROCÉDÉ D'OBTENTION DE CELLULES DENDRITIQUES, LES CELLULES DENDRITIQUES AINSI OBTENUES ET LEURS UTILISATIONS A DES FINS CLINIQUES

(57) **Abstract:** The invention concerns a method for obtaining dendritic cells which consists in: 1) culturing, during 4 to 6 days, preferably 5 days, mononucleate cells derived from cytopheresis after mobilisation, in a serum-free medium with added human albumen in the presence of a granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL) blocking the differentiation towards the macrophage path; 2) adding to the culture medium TNF- $\alpha$  and optionally an inflammatory mediator and proceeding with the culture during 1 to 4 days, preferably 2 more days; 3) recuperating the resulting dendritic cells. Said cells are useful in immunotherapy.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet un procédé pour l'obtention de cellules dendritiques qui consiste: 1) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours, des cellules mononucléées issues de cytophérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complété avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différenciation vers la voie macrophagique; 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- $\alpha$  et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours, de préférence 2 jours supplémentaires; 3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées. Applications : agents d'immunothérapie.

A1

WO 01/09288

PROCEDE D'OBTENTION DE CELLULES DENTRITIQUES, LES CELLULES DENTRITIQUES AINSI OBTENUES ET LEURS UTILISATIONS A DES FINS CLINIQUES

La présente invention concerne le domaine de l'immunothérapie et plus particulièrement celui des cellules dendritiques et de leur utilisation à titre d'agent 5 d'immunothérapie.

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire primaire et des études cliniques pilotes ont mis en évidence leur capacité à induire une immunité anti-tumorale efficace.

Les cellules dendritiques, qui sont présentent dans la peau (cellules de 10 Langerhans), dans les muqueuses, le sang périphérique et la moelle osseuse, sont les cellules présentant des antigènes (Antigen-presenting cells ou APC) les plus puissantes dans le système immunitaire. Elles sont caractérisées par une morphologie unique et un phénotype de surface spécifique.

En particulier, elles expriment l'antigène CD83 et sont capables d'exprimer 15 des quantités importantes de MHC classes I et II et d'initier des réactions mixtes avec les leucocytes (MLR). En revanche, elles sont dépourvues de certains marqueurs myéloïdes, notamment du marqueur CD14.

Etant donné leurs propriétés spécifiques, ces cellules ont été proposées 20 comme éléments essentiels dans les thérapies cellulaires qui nécessitent la présentation d'antigènes aux lymphocytes T.

Les cellules dendritiques (DC) ont un mode de différenciation spécifique qui comprend deux stades importants, le stade immature et le stade mature, selon un ensemble de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (1.2). Les DC immatures obtenues *in vitro* à partir de monocytes par culture avec un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et une interleukine bloquant la différenciation vers la voie macrophagique (IL-4 ou IL-13) sont analogues aux DC du tissu périphérique, c'est-à-dire aux cellules de Langerhans et aux cellules dendritiques interstitielles. Ces DC immatures sont capables de capturer les antigènes avec une grande efficacité en utilisant des 25 récepteurs spécialisés, tels que les récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (FcR) (3,4), le récepteur au mannose (MR) (5) et les récepteurs phagocytaires, en particulier CD36 et l'intégrine  $\alpha v \beta 5$  (6). Elles peuvent ainsi internaliser les protéines, les lysats de cellules entières, l'ARN et les cellules apoptotiques. En revanche, elles expriment seulement de faibles taux 30 de molécules costimulatrices nécessaires pour l'activation des lymphocytes T.

Lorsqu'elles sont exposées à des signaux de maturation, donnés principalement par les antigènes, les cytokines inflammatoires ou les produits bactériens, les DC perdent leurs capacités phagocytaires et endocytaires (5,6) mais accroissent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, du CMH de classe II, l'expression de CD80 et CD86 et deviennent de très puissantes cellules présentant des antigènes (APC). Le passage du stade immature au stade mature est associé à l'expression des récepteurs des chémokines. Les DC matures ont une expression diminuée de CCR1 et CCR5, qui sont les récepteurs des chémokines inflammatoires, les protéines inflammatoires de macrophages MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES, et de façon concomitante, elles ont une expression augmentée de CCR7, qui est le récepteur pour le ligand E1B (ELC)/MIP-3 $\beta$ , lequel est exprimé de façon constitutive dans les organes lymphoïdes secondaires (7-9). Ces changements dans l'expression des récepteurs des chémokines sont importants pour la circulation *in vivo* des DC. Les DC immatures sont recrutées par les chémokines inflammatoires dans les sites d'entrée des antigènes. Après activation par les antigènes et stimuli inflammatoires, elles perdent les récepteurs CCR1 et CCR5 et acquièrent l'expression de CCR7. Les DC matures peuvent ensuite entrer dans les vaisseaux lymphatiques et migrer vers les ganglions lymphatiques afférents où elles présentent des épitopes dérivés d'antigènes pour les lymphocytes naïfs et les lymphocytes mémoires présents dans ces ganglions.

Ainsi, on a déjà proposé de les utiliser en tant que vecteurs pour des vaccinations anti-tumorales (10). Récemment, Nestle et al. ont montré que l'injection intralymphatique de DC immatures activées avec des peptides tumoraux ou des lysats cellulaires tumoraux ont pu provoquer une réponse immunitaire anti-mélanome (11).

L'utilisation de cellules dendritiques à des fins d'immunothérapie nécessite plusieurs millions de cellules à plusieurs reprises. De plus, ces cellules doivent être capables de circuler dans le corps humain de manière sélective vers les ganglions pour que le traitement soit efficace. Il importe également de disposer de cellules engagées de façon irréversible dans la voie de différentiation dendritique, c'est-à-dire de cellules matures qui ne soient pas susceptibles de se transformer dans l'organisme en macrophages.

Plusieurs études concernant la modulation des récepteurs des chémokines ont été réalisées avec des DC obtenues par culture dans un milieu contenant du sérum de veau fétal (FCS). Or, les antigènes xénogènes peuvent être

immunodominants et peuvent gêner le développement de l'immunité anti-tumorale spécifique.

Différentes équipes de chercheurs se sont donc concentrées sur la production de DC dérivées de monocytes dans des milieux exempts de FCS en utilisant des milieux complémentés avec 1 à 10 % de plasma autologue (12-17), de sérum autologue (18) ou d'un pool de sérums humains AB (13,19-22,31). Toutefois, même le sérum autologue peut poser un problème puisqu'il contient de nombreuses protéines, en particulier des anticorps (23) qui peuvent modifier la voie de fixation et de modification intracellulaire des antigènes. De plus, certains antigènes tumoraux de type MUC-1 dans plusieurs cancers ou l'immunoglobuline monoclonale dans le myélome multiple, sont présents dans le sérum à des taux élevés et variables, ce qui peut affecter une présentation reproductible par les DC.

Pour toutes ces raisons, des procédés d'obtention de DC capables d'activer les lymphocytes T dans des milieux exempts de sérum ont été proposés (24-26).

Les demandes internationales WO98/23728, WO98/06823 et WO98/06826 décrivent également des procédés d'obtention des cellules dendritiques dans des milieux exempts de sérum. La demande internationale WO98/06826 décrit entre autre l'utilisation d'un milieu exempt de sérum, le milieu X-VIVO 15 complémenté avec 1% d'albumine humaine (HA). Il est précisé dans cette demande que l'utilisation de 1% de HA n'améliore pas de façon significative la croissance des cellules, leur phénotype ou leur capacité stimulante. De plus, l'expression de CD86 est augmentée au bout de 14 jours de culture dans un tel milieu.

On a maintenant trouvé, de façon surprenante, que l'on peut obtenir des quantités importantes de cellules dendritiques, qui peuvent être utilisées en immunothérapie par culture de cellules mononucléées particulières dans un milieu exempt de sérum convenablement complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes macrophages (GM-CSF) et d'une cytokine, en particulier l'interleukine-4 (IL-4) ou l'interleukine-13 (IL-13) puis en présence d'au moins un médiateur inflammatoire, tel que par exemple le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ).

Ainsi le procédé de l'invention consiste :

35 1) à cultiver pendant 4 à 6 jours, de préférence 5 jours des cellules mononucléées issues de cytaphérèse après mobilisation dans un milieu exempt

de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocyte-macrophage (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différentiation vers la voie macrophagique ;

5 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- $\alpha$  et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours, de préférence 2 jours supplémentaires ;

3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.

Avantageusement, on peut ajouter au milieu de culture, les deuxième et quatrième jours, du milieu frais contenant du GM-CSF et une interleukine.

10 10 Selon une variante de mise en œuvre du procédé de l'invention, on peut utiliser de la prostaglandine E2 (PGE2) conjointement avec le TNF- $\alpha$ .

15 Par "milieu de culture sans sérum" on désigne tout milieu de culture couramment utilisé pour la culture des cellules à des fins cliniques, qui contient les substances nutritives essentielles pour la croissance des cellules hématopoïétiques notamment une source de carbone, d'azote, de la transferrine.

Ces milieux sont exempts de sérum humain ou de sérum animal.

Des exemples de milieux de culture exempts de sérum appropriés aux fins de l'invention sont décrits par exemple dans WO95/00632 et US5 405 772.

20 Des exemples particuliers de tels milieux sont les milieux X-VIVO 10 ou X-VIVO 15 commercialisés par la société Biowhittaker, Walkersville, MD, USA.

Le milieu X-VIVO 15 est particulièrement préféré pour la mise en œuvre de l'invention.

Le milieu de culture doit être complémenté avec de l'albumine humaine à raison de 1 à 2 % (poids/volume), de préférence 2 %.

25 Par "cellules mononucléées" on désigne les cellules mononucléées (MNC) provenant du sang périphérique de sujets normaux ou de patients présentant un cancer ou toute autre maladie dans laquelle le système immunitaire est impliqué, telle que les maladies infectieuses, virales ou parasitaires, par exemple le Sida ou les maladies dysimmunitaires, telles que par exemple la polyarthrite rhumatoïde, le lupus, etc.

Les cellules mononucléées (MNC) utilisées comme produit de départ dans le procédé selon l'invention sont des cellules mononucléées obtenues par cytophérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un facteur de croissance cellulaire.

35 Ainsi, les cellules mononucléées utilisées dans le procédé de l'invention proviennent soit de sujets normaux ou de patients présentant un cancer qui ont

5 été soumis à une chimiothérapie, à savoir à un traitement spécifique à l'aide d'un agent chimiothérapeutique et éventuellement d'un facteur de croissance cellulaire, soit de patients présentant une maladie infectieuse, virale ou parasitaire qui ont été traités avec un facteur de croissance cellulaire, tel que les cytokines, y compris les facteurs de croissance hématopoïétiques.

10 A titre d'exemple de facteur de croissance qui peuvent être utilisés pour la mobilisation des cellules mononucléées, on peut citer :

15 - les facteurs stimulants les colonies de granulocytes (G-CSF), tels que les produits connus sous les dénominations commerciales « filgrastim NEUPOGEN » de Amgen-Roche, « Lenograstim GRANOCYTE » de Rhône-Poulenc/Chugai ;

20 - les facteurs stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), tel que les produits connus sous les dénominations commerciales LEUCOMAX de Schering Plough ou le facteur de croissance des cellules souches (SCF) de Amgen.

25 Les cellules mononucléées mobilisées qui sont mises en œuvre selon l'invention comprennent notamment les monocytes, les lymphocytes, les cellules souches hématopoïétiques.

30 La mobilisation par chimiothérapie est réalisée à l'aide de l'agent chimiothérapeutique approprié au type de cancer présenté par le patient, donneur des cellules à utiliser dans le procédé de l'invention. On peut utiliser un agent chimiothérapeutique quelconque, tel que par exemple le cyclophosphamide.

35 Les quantités de GM-CSF, d'interleukine, de TNF- $\alpha$  et de PGE2 à utiliser dans le procédé de l'invention sont celles qui sont habituellement utilisées pour les cultures cellulaires.

40 On précisera que le GM-CSF peut être utilisé à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 50 à 500 ng/ml, avantageusement 100 ng/ml de milieu.

45 L'interleukine est généralement utilisée en des quantités allant de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml, de préférence 10 à 50 ng/ml, avantageusement 25 ng/ml de milieu. On peut également utiliser le TNF- $\alpha$  à raison de 1 ng/ml à 1 000 ng/ml et la PGE2 à raison de 10 ng/ml à 10  $\mu$ g/ml, avantageusement de 20 ng/ml à 1  $\mu$ g/ml.

La culture des cellules précurseurs de cellules dendritiques est réalisée dans des récipients en plastique couramment utilisées dans ce domaine, tels que les flacons ou sacs de cultures cellulaires permettant l'adhérence des 5 cellules.

La culture est avantageusement réalisée dans des incubateurs dans les conditions normales de culture de cellules (stérilité ; CO<sub>2</sub> environ 5 % ; humidité environ 95 % et température environ 37°C).

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet des cellules dendritiques qui 10 sont  $\alpha\beta_3^-$  ;  $\alpha\beta_5^+$  ; CCR5<sup>-</sup> et CCR7<sup>+</sup>, c'est-à-dire qu'elles sont dépourvues des récepteurs  $\alpha\beta_3$  et CCR5 et pourvues des récepteurs  $\alpha\beta_5$  et CCR7.

Ces cellules dendritiques, qui peuvent être obtenues par le procédé défini précédemment, sont des cellules matures irréversibles. Elles sont utilisables comme agent d'immunothérapie dans toutes les thérapies cellulaires, telles que 15 par exemple le traitement des cancers ou des maladies infectieuses, virales ou parasitaires.

Ainsi l'invention a également pour objet l'utilisation des cellules dendritiques  $\alpha\beta_3^-$  ;  $\alpha\beta_5^+$  ; CCR5<sup>-</sup> et CCR7<sup>+</sup> pour la fabrication d'un agent 20 d'immunothérapie utile pour le traitement de toute maladie impliquant le système immunitaire.

En effet, avec les cellules dendritiques selon l'invention on peut réduire l'internalisation et la présentation de protéines xénogènes, allogènes ou autologues non identifiées et limiter ainsi les réponses immunitaires qui ne sont pas spécifiques aux antigènes tumoraux.

25 Les DC selon l'invention sont capables de capturer *in vivo* des antigènes tumoraux soit par endocytose des protéines soit par phagocytose des cellules apoptotiques.

Ces DC sont capables de migrer vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les peptides dérivés d'antigènes dirigés contre les lymphocytes T. 30 Elles sont également capables de produire l'interleukine-12 favorisant une différenciation des cellules CD8+ naïves en des lymphocytes T cytotoxiques. Elles présentent un phénotype stable après retrait des cytokines utilisées lors des cultures *ex vivo*.

Le procédé de l'invention permet d'obtenir des cellules dendritiques 35 immatures et des cellules dendritiques matures.

En présence de GM-CSF et d'une interleukine, on obtient des cellules dendritiques immatures CD83- CD14<sup>faible</sup>. Ces DC expriment HLA-DR, CD80 et CD86 ainsi que des récepteurs endocytaires et phagocytaires, à savoir MR, CD36 et  $\alpha$ v $\beta$ 5.

5 De plus, ces DC immatures sont capables de phagocytter des cellules tumorales apoptotiques par la phagocytose des monocytes apoptotiques. Une stimulation de ces DC immatures avec du TNF- $\alpha$  plus GM-CSF et IL-4 pendant 2 jours supplémentaires conduit à l'obtention de cellules correspondant de façon phénotypique et fonctionnelle à des cellules dendritiques matures. Ces cellules 10 matures ont exprimé CD83 et des quantités plus élevées de HLA-DR, CD80 et CD86 par rapport aux DC immatures GM/IL-4.

Elles sont capables d'activer les lymphocytes T allogènes avec la même efficacité que les DC matures obtenues en présence de FCS.

15 De plus, ces DC matures expriment également des récepteurs endocytaires comme les récepteurs au mannose ou les récepteurs à la phagocytose de type  $\alpha$ v $\beta$ 5 et CD36. Ces DC matures ont toutefois une capacité pour endocytter le dextrane ou phagocytter les cellules tumorales apoptotiques plus faibles que les DC immatures dont elles sont issues.

La réponse aux chémokines pour les DC obtenues selon l'invention, a été 20 modulée de façon similaire à celle des DC obtenues dans du milieu contenant du FCS. En fait, les DC immatures obtenues selon l'invention ont exprimé CCR5 et n'ont pas répondu à MIP-3 $\beta$ . Ainsi, après injection *in vivo*, ces cellules devraient être piégées de préférence dans des sites inflammatoires où MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  ou RANTES sont produits (25). Après traitement avec du TNF- $\alpha$ , les DC selon 25 l'invention ont perdu l'expression de CCR5 et ont acquis la capacité de répondre à MIP-3 $\beta$ . On peut penser qu'une proportion élevée de ces DC matures sera capable d'être piégée dans des zones de ganglions lymphatiques de cellules T où le MIP-3 $\beta$  est produit et d'initier une réponse immunitaire efficace.

De plus, on a montré que la PGE2 qui est connue pour accroître la 30 maturation des DC dans des milieux sans FCS (14,21), peut jouer un rôle sur la migration des DC. Dans les conditions de culture selon l'invention, la PGE2 n'a pas largement modifié le phénotype des DC produites avec GM/IL-4 et TNF, à l'exception d'un accroissement de l'expression de CD83, et n'a pas d'effet additif supplémentaire avec TNF- $\alpha$  pour l'activation des cellules T. Toutefois, la PGE2 a 35 accru la migration des DC en réponse à MIP-3 $\beta$ . La migration des DC dans les organes lymphoides peut donc être sélective.

Afin d'induire la production des cellules T cytotoxiques anti-tumoriales, les DC doivent être capables de diriger la différenciation des cellules T naïves vis-à-vis du sous-ensemble de type 1 exprimant IFN- $\gamma$  et IL-2. L'IL-12 constitue la cytokine principale impliquée dans la polarisation de cellules TCD4+ vis-à-vis des cellules Th1. Dans le modèle de réponse des cellules T anti-EBV, il a été mis en évidence que l'expression de IL-10 par des lignées cellulaires lymphoblastoïdes est associée avec l'émergence des cellules T CD8+ de type 2 (32) qui produisent IL-4 et IL-10 et qui ne sont pas cytotoxiques (33). Au contraire, les cellules CD8+ de type 1 produisent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 et sont cytotoxiques. Ainsi, des DC produites *in vitro* à des fins de vaccination anti-tumoriale doivent idéalement produire IL-12 et non IL-10. En effet, IL-10 possède un effet nocif supplémentaire sur la maturation des DC. En fait, les DC traitées avec IL-10 pendant la phase de maturation induisent l'anergie spécifique aux antigènes des cellules T CD4+ et CD8+ (25,34). Les DC obtenues selon l'invention, différentes de celles obtenues en présence de FCS (35,36), ont produit uniquement de faibles quantités de IL-12 mais des quantités importantes de IL-10 en réponse à la ligature à CD40, en accord avec les études montrant que les DC myéloïdes étaient capables de produire IL-10, en particulier en suivant la stimulation par CD40 (37,38).

Toutefois, on a montré que la maturation des DC induites par TNF- $\alpha$  a entraîné l'induction de la production de IL-12 et une inhibition dramatique de la synthèse de IL-10 après activation par CD40. Ainsi, les DC matures selon l'invention sont capables de déclencher la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T de type 1. L'addition de PGE2 a de plus inhibé la production de IL-10 mais également la production de IL-12 matures obtenues.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement immunothérapeutique qui consiste à prélever à un patient à traiter des cellules mononucléées par cytaphérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou avec un facteur de croissance cellulaire et éventuellement congélation/décongélation, à traiter lesdites cellules selon le procédé défini ci-dessus et à les activer au cours de l'étape 2) dudit procédé (étape de maturation) par des antigènes spécifiques selon les procédures habituelles bien connues de l'homme de métier, par exemple par endocytose et ensuite à réinjecter les cellules DC obtenues audit patient.

Avantageusement, ces cellules dendritiques peuvent être congelées après l'étape de maturation/activation selon les techniques habituelles sans modification substantielle de leurs propriétés.

Les DC selon l'invention conviennent en particulier pour les traitements par 5 allogreffes ou autogreffes.

L'invention va être illustrée plus en détail par les exemples ci-après donnés à titre non limitatifs et par les figures qui représentent ci-après :

- la Figure 1 montre l'effet de la maturation des DC sur l'endocytose de FITC-dextran :

10 A) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF et IL-4 ;

B) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF, IL-4 et TNF- $\alpha$  ;

15 C) avec des DC obtenues par culture sur milieu X-VIVO 15-2 % HA en présence de GM-CSF, IL-4 et PGE 2.

Les courbes en pointillés correspondent au temps d'incubation des DC avec FITC-dextran de 7 minutes, les courbes en traits pleins à l'incubation pendant 15 minutes et les courbes en traits gras à l'incubation pendant 30 minutes ; sur l'axe des abscisses sont indiquées l'intensité de fluorescence et 20 sur l'axe des ordonnées le nombre d'événements ;

- la Figure 2 montre l'apoptose de cellules XG-1 par le cycloheximide (CHX) par mesure de la fluorescence des cellules colorées par l'Annexin-V FITC et par l'iode de propidium (PI) ;

25 - la Figure 3 montre la phagocytose des cellules tumorales apoptotiques par les DC immatures et l'absence de phagocytose par les DC matures ;

30 - la Figure 4 montre l'effet de la maturation des DC sur l'expression de CCR5.

- la Figure 5 montre la migration des DC matures et la non-migration des cellules immatures en réponse à (ELC)/MIP-3 $\beta$ .

35 - la Figure 6 montre l'activation des cellules T allogènes par les DC matures.

**EXEMPLE 1 : Production des cellules dendritiques (DC)**

On a recueilli des cellules de cytaphérèse (AC) provenant de quatre patients présentant différents cancers pendant la mobilisation des précurseurs 5 hématopoïétiques avec le cyclophosphamide et le facteur humain de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF, filgrastim ; NEUPOGEN, Amgen-Roche, Neuilly-sur-Seine, France). Chaque lot de cellules AC recueillies a été congelé dans de l'azote liquide puis décongelé et lavé à deux reprises en présence d'un chélateur du calcium et du magnésium. Chaque lot de cellules a ensuite été mis 10 dans un flacon de culture cellulaire contenant du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % d'albumine humaine (X-VIVO-2% HA) et on a laissé les cellules adhérer sur la surface du flacon de culture pendant 2 h. On a éliminé les cellules qui n'ont pas adhéré et on a cultivé les cellules qui ont adhéré en présence de 100 ng/ml de GM-CSF (Leucomax, Sandoz, Basel, Suisse) et 25 ng/ml de IL-4 15 (R&D Systems, Minneapolis, MN) pendant 7 jours dans du milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % de HA. A des fins de comparaison, on a également cultivé des cellules qui ont adhéré en présence de 100 ng/ml de GM-CSF et 25 ng/ml de IL-4 soit dans du milieu RPMI 1640 complémenté avec 10 % de FCS (milieu de référence), soit dans du milieu X-VIVO 15 seul ou dans du milieu X- 20 VIVO 15 complémenté avec 5 % de SAB, 5 % de sérum autologue ou 5 % de plasma autologue. Dans chaque cas, on a ajouté les deuxième et quatrième jours du milieu frais contenant GM-CSF et IL-4. Après 5 jours de culture, on a ajouté du milieu contenant GM-CSF et IL-4 avec du TNF- $\alpha$  (R&D Systems) à 20 ng/ml ou du TNF- $\alpha$  à 20 ng/ml et du PGE2 (Sigma Chemical, St Louis, MO) à 25 1  $\mu$ g/ml. Après 48 h, on a recueilli les cellules et on les a comptées. Le rendement en cellules est donné dans le tableau I où on constate que le rendement en cellules obtenu en présence de GM-CSF et de IL-4 a atteint 12 % avec du sérum AB, 18 % avec du plasma autologue, 22 % avec du sérum autologue et 16 % avec du HA. Le milieu X-VIVO 15-2 % de HA complémenté 30 avec GM-CSF et IL-4 est le milieu le plus efficace pour obtenir des DC immatures de qualité clinique CD14<sup>-faible</sup> CD83<sup>+</sup> HLA-DR<sup>++</sup> exprimant de grandes quantités de CD80 et CD86.

35 Comme le montrent également les résultats du tableau I, le sérum AB, le plasma autologue et le sérum autologue ont été moins actifs que HA pour l'obtention *in vitro* des DC matures.

Etant donné qu'une cytaphérèse de 5 heures permet en général de récupérer 40 à 50 x 10<sup>9</sup> cellules mononucléées, on a donc pu obtenir dans les conditions opératoires de l'invention 6 à 8 x 10<sup>9</sup> DC de façon reproductible. Cette quantité de cellules est suffisante pour permettre au moins 6 vaccinations

5 avec 10<sup>9</sup> DC.

La culture de cellules sur milieu X-VIVO 15 seul a été réalisée à partir des cellules de cytaphérèse de 8 donneurs mobilisées par le facteur de croissance hématopoïétique (G-CSF) ou par le cyclophosphamide et le facteur de croissance hématopoïétique.

10 Pour 5 des 8 donneurs, les cellules cultivées en milieu X-VIVO 15 en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant 7 jours avaient une viabilité inférieure à 65% ce qui n'a pas permis d'analyser leur phénotype et leurs fonctions contrairement aux cellules des mêmes donneurs cultivées en présence de X-VIVO 15-2% d'albumine humaine, GM-CSF et IL-4 pendant 7 jours.

15 Le milieu X-VIVO 15 seul ne permet pas de générer de façon reproductible des cellules dendritiques immatures. L'addition de 2% d'albumine humaine a permis dans tous les cas une génération de cellules dendritiques parfaitement viables et fonctionnelles et irréversibles.

20 **EXEMPLE 2 : Analyse phénotypique par cytométrie de flux des cellules DC**

Pour caractériser le phénotype des DC obtenues selon l'exemple 1, on a déterminé le pourcentage de cellules exprimant CD14, HLA-DR, CD83, CD80 et CD86 par cytométrie de flux (FACS) en utilisant les anticorps monoclonaux suivants : CD1a-PE, CD14-PE, CD36-FITC, CD80-PE, CD83-PE, HLA-DR-FITC (Immunotech, Marseille, France) ; les anticorps monoclonaux CCR5-PE, CD51/CD61-FITC, CD86-FITC, MR-PE (Pharmingen, San Diego, CA) et les anticorps murins IgG appariés suivant l'isotype (Immunotech).

Le phénotype total des DC obtenus selon l'exemple 1 est similaire à celui des DC immatures obtenues par culture dans le milieu RPMI en présence de

30 FCS (tableau I). En utilisant le milieu X-VIVO 15 complémenté avec du sérum AB, du plasma autologue ou du sérum autologue, le pourcentage des cellules CD14\* a été grandement augmenté (jusqu'à 80 % dans du X-VIVO 15-sérum AB) et les cellules résultantes ont exprimé une densité plus faible de HLA classe II et de molécules costimulatrices. En revanche, selon le procédé de l'invention, 35 c'est-à-dire avec le milieu X-VIVO 15-2 % de HA, on a pu obtenir un nombre élevé de DC (CD14\*, HLA-DR\*\*, CD80\*\*, CD86\*\*) sans addition de protéines

xénogènes, de protéines allogènes, d'anticorps humains ou d'antigènes tumoraux autologues non identifiés.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des AC provenant de quinze donneurs, cultivées dans les conditions opératoires de l'invention, c'est-à-dire 5 dans un milieu X-VIVO 15 complémenté avec 2 % d'albumine humaine en présence de GM-CSF, IL-4 et TNF- $\alpha$  avec ou sans PGE2. Ces résultats figurent dans le tableau II.

Le CD83, marqueur spécifique des DC matures, a pu être détecté après 24 h de culture en présence de TNF- $\alpha$  et a atteint un maximum 10 d'expression en 48 h. La combinaison de PGE2 et TNF- $\alpha$  a induit l'expression de CD83 jusqu'à 83 % de cellules par rapport à 64 % avec du TNF- $\alpha$  seul ( $p = 0,007$ ) (tableau II). Les PGE2 ont également coopéré avec le TNF- $\alpha$  pour la régulation en amont de CD80 et CD86 sur les DC (tableau I et tableau II).

Dans une autre série d'expériences, on a opéré dans les mêmes conditions 15 que ci-dessus sauf que le cinquième jour, on a ajouté la PGE2 sans TNF- $\alpha$ .

Le pourcentage des cellules CD14 $^{+}$  obtenues en présence de GM-CSF + IL-4 + PGE2 était supérieur à celui obtenu en présence de GM-CSF et IL-4 seuls, ce qui suggère que le PGE2, lorsqu'il est utilisé sans TNF- $\alpha$  induit 20 la réversion d'au moins certaines DC immatures en cellules de type macrophage bien que le GM-CSF et IL-4 étaient continuellement présents dans le milieu de la culture.

De la même façon, quand les DC immatures, obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA complémenté avec GM-CSF et IL-4, ont été récoltées le 25 septième jour, lavées de façon extensive et cultivées dans le milieu de culture sans cytokine pendant 3 jours supplémentaires, elles ont de nouveau adhéré au sac de culture et ont exprimé CD14. Il s'agit là d'une réversion de ces DC immatures en cellules de type macrophage. En revanche, la morphologie cellulaire et le phénotype cellulaire des DC matures, produites par addition de TNF- $\alpha$  seul ou de TNF- $\alpha$  + PGE2, n'ont pas été affectés de façon marquée 30 après retrait des cytokines, ce qui indique que la maturation a eu lieu de manière irréversible.

### **EXEMPLE 3 : Endocytose par MR**

On a étudié l'endocytose au niveau cellulaire des DC obtenues par culture 35 de cellules AC mobilisées selon le traitement indiqué dans l'exemple 1 dans du milieu X-VIVO 15 - 2 % HA en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant cinq

jours. Le cinquième jour, on a ajouté du milieu frais contenant GM-CSF et IL-4, ou GM-CSF, IL-4 et TNF- $\alpha$  ou GM-CSF et IL-4, TNF- $\alpha$  et PGE2. Le septième jour, on a déterminé l'expression de MR, CD36,  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  par la méthode d'analyse FACS.

5 Pour déterminer l'expression du marqueur MR on a opéré selon la méthode décrite par Tarte et al. (27) en utilisant du FITC-dextran pouvant fixer la lysine, MM = 40 000 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). On a recueilli les DC immatures et matures le septième jour et on les incubées à 37°C pendant 7, 15 et 30 min ou à 4°C pendant 30 min (fixation de fond) avec 1 mg/ml de FITC-dextran. On a ensuite lavé les DC avec du PBS froid complémenté avec 1 % de FCS et 0.02 de NaN<sub>3</sub> et on a analysé la fluorescence avec un appareil FACScan.

La moyenne du pourcentage de cellules positives obtenues par culture des AC de six donneurs est indiquée dans le tableau III.

15 Ces résultats montrent que les DC immatures obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA par culture de 7 jours avec GM-CSF et IL-4 ont largement exprimé des MR et cette expression a significativement diminué de plus de 50 % lors de la maturation des DC induite soit par TNF- $\alpha$  seul ( $p = 0,03$ ), soit par TNF- $\alpha$  + PGE2 ( $p = 0,03$ ).

20 L'endocytose du FITC-dextran par les cellules matures obtenues selon l'invention avec du TNF- $\alpha$  ou du TNF- $\alpha$  + PGE 2 a profondément diminué par rapport aux DC immatures comme cela est montré par la Figure 1.

#### **EXEMPLE 4 : Induction de l'apoptose dans les cellules plasmatiques malignes**

25 Pour tester le potentiel phagocytaire des DC obtenues selon le procédé de l'invention, on a utilisé des cellules tumorales apoptotiques.

XG-1 est une lignée cellulaire de myélome multiple dont les caractéristiques ont été décrites en détail par Zhang et al. (28). On a incubé des cellules XG-1 ( $2,5 \times 10^5$ /ml) avec 4  $\mu$ m/ml de cycloheximide (CHX) dans du milieu RPMI 1640-10 % de FCS complémenté avec 3 ng/ml de IL-6 à 37°C. On a enregistré la cinétique de l'apoptose cellulaire en utilisant une double coloration avec le colorant connu sous la dénomination Annexin-V FITC (Boehringer Mannheim, Meylan, France) et de l'iode de propidium (PI) (Sigma). Dans un premier temps, les cellules apoptotiques ont été colorées uniquement par l'Annexin-V (Annexin-V $^+$ /PI $^-$ ) tandis que dans un deuxième temps, les cellules 35 nécrotiques ont incorporé également du PI en raison d'une perte de l'intégrité de leur membrane (Annexin-V $^+$ /PI $^+$ ). Après traitement avec le CHX, on a lavé les

cellules tumorales à trois reprises dans du X-VIVO 15-2 % de HA avant de les mettre en coculture avec des DC obtenues selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2. Ces résultats montrent 5 qu'après 6 h de culture avec 4 µg/ml de CHX, 60 % des cellules de myélome XG-1 ont montré des caractéristiques de mort cellulaire apoptotique précoce, c'est-à-dire une liaison de Annexin-V mais une non-incorporation de PI.

#### **EXEMPLE 5 : Phagocytose des cellules apoptotiques**

10 La phagocytose des cellules apoptotiques constitue un autre mode d'entrée des antigènes et joue un rôle majeur dans le phénomène d'amorçage croisé. Récemment, plusieurs récepteurs phagocytaires ont été identifiés sur les DC obtenues en présence des sérum humains et il a été montré qu'un milieu conditionné pour des monocytes (MCM), qui conduit à une maturation des DC 15 irréversible, régule en aval leur expression (6).

On a teinté en vert les DC immatures et matures en utilisant du PKH67-GL (Sigma) et on les a cultivées pendant 2 h pour permettre la libération du colorant non lié. On a teinté en rouge des cellules XG-1 en utilisant du PKH26-GL (Sigma) selon les instructions du fabricant avant leur induction pour subir 20 l'apoptose par CHX pendant 6 à 8 h. Ensuite, on a cocultivé les cellules XG-1 teintées en rouge avec des DC immatures ou matures teintées en vert dans un rapport de 1:1 dans du X-VIVO 15-2 % de HA selon le protocole décrit par Albert et al. (6). Après 90 min à 37°C, on a analysé les fluorescences vertes et rouges avec un appareil FACScan. Dans les expériences de blocage, on a 25 co-incubé les cellules XG-1 et les DC à 4°C.

Les marqueurs CD36,  $\alpha\text{v}\beta3$  et  $\alpha\text{v}\beta5$  ont été déterminés selon la méthode par marquage par anticorps monoclonaux et cytométrie de flux.

Pour la coloration de  $\alpha\text{v}\beta5$ , on a tout d'abord incubé les cellules avec un 30 anticorps mAb primaire  $\alpha\text{v}\beta5$  (Chemicon Int, Temecula, CA), puis avec un anticorps de chèvre anti-Ig de souris conjugué à FITC (Immunotech). On a réalisé les analyses avec un appareil FACScan (Becton Dickinson).

Les données provenant d'une expérience représentative parmi 3 sont 35 représentées sur la figure 3. Plus d'un tiers des DC immatures ont englouti des XG-1 apoptotiques après 90 min de coculture. Seuls 10 à 12 % des DC immatures ont été teintées deux fois après coculture avec des cellules XG-1 non-apoptotiques. La phagocytose des cellules tumorales par des DC immatures

a été confirmée visuellement sur des cytospines de cocultures teintées. La phagocytose a été complètement bloquée à basse température (figure 3). L'induction de la maturation des DC a produit une diminution de l'activité phagocytaire. En effet, seuls 12 % des DC matures obtenues après addition de 5 TNF- $\alpha$  ont internalisé les XG-1 apoptotiques après 90 min de coculture (figure 3). Une même diminution de la phagocytose a été obtenue avec des DC matures obtenues avec TNF- $\alpha$  + PGE2 (figure 3).

Dans les conditions de l'invention, les DC immatures ont exprimé des quantités élevées de CD36 et d'intégrine  $\alpha\beta 5$ ; en revanche l'intégrine  $\alpha\beta 3$  n'a 10 pas été détectée comme le montrent les résultats consignés dans le tableau III. Ces résultats montrent également qu'en présence de TNF- $\alpha$ , les expressions de CD36 et  $\alpha\beta 5$  ont été significativement diminuées respectivement de plus d'un demi (p = 0,002) et de 20-35 % (p = 0,03). Le PGE2 n'a pas eu d'effet supplémentaire avec le TNF- $\alpha$  pour la diminution de l'expression des récepteurs 15 phagocytaires.

#### **EXEMPLE 6 : Réponse aux chémokines des DC**

On a répété l'opération avec six donneurs différents et on a mesuré l'intensité moyenne de fluorescence (MFI). Les résultats obtenus figurent dans le 20 tableau 4.

##### **1) détection du récepteur CCR5**

Dans ce test, on a utilisé l'anticorps monoclonal anti-CCR5 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) pour détecter le récepteur CCR5 qui est un récepteur pour les chémokines inflammatoires.

25 On a incubé les cellules DC matures ou immatures obtenues dans le milieu X-VIVO 15 - 2 % HA avec ledit anticorps marqué et on a mesuré l'expression de CCR5 pour un donneur. Les résultats sont rassemblés dans les figures 4a, 4b et 4c.

Dans cet exemple, on a recherché la présence du CCR5 sur les DC 30 immatures et les DC matures produites dans du milieu X-VIVO 15 - 2 % HA.

Le CCR5, a été détectable sur les DC immatures produites dans du milieu X-VIVO 15-2 % HA mais son expression a été significativement réduite par une incubation de 48 h avec du TNF- $\alpha$  (p = 0,03). Le PGE2 n'a pas induit de diminution significative supplémentaire (figure 4) (p = 0,25).

## 2) détection du récepteur CCR7

Comme aucun anticorps monoclonal n'était disponible pour mesurer l'expression de CCR7, on a testé la réponse des DC à MIP-3 $\beta$  dans un essai de chimiotactisme.

5 On a introduit les DC immatures et matures ( $2 \times 10^5$  cellules) dans 100  $\mu$ l de RPMI-1 % de HA dans la chambre supérieure d'un dispositif de séparation de cellules constitué de deux chambres de culture cellulaire (une chambre inférieure et une chambre supérieure séparées par un filtre ayant des pores de 5  $\mu$ m permettant le passage des cellules migratrices (dispositif Transwell de Costar,

10 Cambridge, MA). Dans la chambre inférieure, on a introduit 600  $\mu$ l de ELC/MIP-3 $\beta$  dilués à 100 ng/ml dans le même milieu. Après une incubation de 4 h à 37°C, on a recueilli les cellules qui ont migré dans la chambre inférieure et on a comptées au microscope. On a exprimé les résultats par le pourcentage des cellules d'entrée qui ont migré dans la chambre inférieure (pourcentage des

15 cellules migratrices). La migration des DC provenant d'un donneur en l'absence et en présence de MIP-3 $\beta$  est représentée sur la figure 5A et les résultats obtenus avec les DC issues d'AC de 6 donneurs avec MIP-3 $\beta$  sont consignées sur la figure 5B. Les DC immatures cultivées avec GM-CSF et IL-4 n'ont pas répondu à MIP-3 $\beta$  (pourcentage moyen de cellules qui ont migré : 0,7 %, n=6).

20 L'addition de TNF- $\alpha$  au cinquième jour a accru significativement la réponse des DC ( $p = 0,002$ ) avec une moyenne de 14,2 % de cellules en migration ( $n = 6$ ). Le PGE2 a agi de façon synergique avec TNF- $\alpha$  puisque 31 à 67 % (moyenne : 48,8 %, n = 6) des DC maturées avec TNF- $\alpha$  + PGE2 ont migré jusqu'à la chambre inférieure du dispositif transwell pendant une durée d'incubation de 4 h

25 à 37°C ( $p = 0,002$ ) par rapport aux DC maturées avec du TNF- $\alpha$ . Ceci a été associé à une légère augmentation de la migration spontanée des DC (une moyenne de 7 % des DC d'entrée a été trouvée dans la chambre inférieure en l'absence de MIP-3 $\beta$ ).

30 **EXEMPLE 7 : Analyse des cytokines**

On a récolté les DC immatures et matures obtenues après 7 jours de culture dans du X-VIVO 15-2 % de HA, on les a lavées et on les a étalées à raison de  $4 \times 10^5$ /ml dans du RPMI 1640-5 % de FCS avec ou sans cellules L transfectées par  $10^5$ /ml de CD40L, (fourni par le Docteur Sem Saeland, Schering-Plough, Dardilly, France). Lorsque cela était indiqué, on a ajouté de l'IFN- $\gamma$  humain recombinant (1000 U/ml, R&D Systems). On a recueilli les

surnageants 24 h à 30 h après stimulation et on les a stockés à -70°C. On a mesuré les quantités de IL-10 et p70 IL-12 par ELISA selon le mode opératoire du fabricant (R&D Systems).

Les DC immatures obtenues avec du GM-CSF/IL-4 n'ont pas produit 5 p70 IL-12 mais ont produit des quantités très élevées de IL-10 après déclenchement par CD40 (tableau 5). L'addition de IFN-γ avec la stimulation par CD40 a entraîné une diminution de 30 fois de la production d'IL-10 par des DC immatures activées par CD40. L'induction de la maturation des DC avec du 10 TNF-α a entraîné une diminution dramatique de la production de IL-10 induite par CD40 (réduction moyenne de 10 fois) en association avec l'induction de l'expression de IL-12. L'addition de IFN-γ a encore inhibé la production de IL-10 par des DC matures. Ceci est en accord avec les rapports précédents montrant que l'IFN-γ pouvait être un cofacteur pour la production de IL-12 induite par CD40 (29,30). Toutefois, pour l'échantillon testé des trois autres patients, l'IFN-γ 15 a réduit la production de IL-12 par DC obtenue en présence de GM-CSF/IL-4 et TNF-α. Enfin, l'induction d'une DC totalement mature avec du TNF-α et PGE2 a entraîné une production réduite de IL-10 et IL-12 après stimulation par CD40 par rapport à TNF-α seul.

#### **EXEMPLE 8 : Réaction des lymphocytes mixtes allogènes (MLR)**

20 On a purifié des lymphocytes T non activés (HLA DR<sup>-</sup>) à partir de sang périphérique de volontaires en bonne santé par deux cycles de sélection négative en utilisant des microbilles revêtues de CD14 et de CD19 (Dynal, Oslo, Norvège), suivi par un cocktail d'anticorps mAbs CD16, CD56 et HLA-DR (Immunotech) et de microbilles d'anti-Ig de souris de chèvre (Dynal). La pureté 25 des cellules T CD3<sup>+</sup> était supérieure à 97 %. On a ajouté des nombres progressifs de DC traitées par de la mitomycine (50 µg/ml) à 1,5 x 10<sup>5</sup> cellules T allogènes dans 200 µl de RPMI-5 % de SAB. Après 5 jours de culture, on a mesuré la prolifération des cellules T par incorporation de thymidine tritiée (1 µCi/puits) pendant les 12 dernières heures. On a exprimé les résultats par les 30 coûts moyens par minute (cpm) ± l'écart type déterminé dans des puits de culture sextuplés.

Les résultats de la figure 6 montrent que la maturation des DC obtenues dans du X-VIVO 15-2 % de HA les a transformées en stimulateurs des cellules T allogéniques aussi puissants que les DC matures produites dans du RPMI-10 % 35 de FCS. Le TNF-α seul a donné les mêmes résultats que l'association de TNF-α et PGE2.

**Références**

1. Hart, D. N. J. 1998. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245.
- 5 2. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
- 10 3. Fanger, N. A., D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R. F. Graziano, L. C. Pfefferkorn, and P. M. Guyre. 1997. Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 158:3090.
- 15 4. Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157:541.
- 20 5. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [see comments]. *J. Exp. Med.* 182:389.
- 25 6. Albert, M. L., S. F. A. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes [In Process Citation]. *J. Exp. Med.* 188:1359.
- 30 7. Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, and A. Mantovani. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083.

8. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:2760.

5

9. Lin, C. L., R. M. Suri, R. A. Rahdon, J. M. Austyn, and J. A. Roake. 1998. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:4114.

10

10. Tarte, K. and B. Klein. 1999. Dendritic-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 13:653.

15

11. Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328.

20

12. Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137.

25

13. Reddy, A., M. Sapp, M. Feldman, M. Subklewe, and N. Bhardwaj. 1997. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 90:3640.

30

14. Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27:3135.

35

15. Murphy, G., B. Tjoa, H. Ragde, G. Kenny, and A. Boynton. 1996. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 29:371.

16. Tjoa, B. A., S. J. Simmons, V. A. Bowes, H. Ragde, M. Rogers, A. Elgamal, G. M. Kenny, O. E. Cobb, R. C. Ireton, M. J. Troychak, M. L. Salgaller, A. L. Boynton, and G. P. Murphy. 1998. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 36:39.

5

17. Thurner, B., C. Roder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender, and G. Schuler. 1999. Generation of large number of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods* 223:1.

10

18. Soruri, A., A. Fayyazi, R. Gieseler, T. Schlott, T. M. Runger, C. Neumann, and J. H. Peters. 1998. Specific autologous anti-melanoma T cell response in vitro using monocyte-derived dendritic cells. *Immunobiology* 198:527.

15

19. Anton, D., S. Dabaghao, K. Palucka, G. Holm, and Q. Yi. 1998. Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scand. J. Immunol.* 47:116.

20

20. Kim, C. J., T. Prevette, J. Cormier, W. Overwijk, M. Roden, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. 1997. Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes in vitro. *J. Immunother.* 20:276.

25

21. Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1997. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 186:1603.

22. Holtl, L., C. Rieser, C. Papesch, R. Ramoner, G. Bartsch, and M. Thurnher. 30 1998. CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer [letter] [In Process Citation]. *Lancet* 352:1358.

23. Apostolopoulos, V., C. Osinski, and I. F. McKenzie. 1998. MUC1 cross-reactive Gal alpha(1,3)Gal antibodies in humans switch immune responses from cellular to humoral [see comments]. *Nat. Med.* 4:315.

5 24. Abdel-Wahab, Z., P. DeMatos, D. Hester, X. D. Dong, and H. F. Seigler. 1998. Human dendritic cells, pulsed with either melanoma tumor cell lysates or the gp100 peptide(280-288), induce pairs of T-cell cultures with similar phenotype and lytic activity. *Cell Immunol.* 186:63.

10 25. Morse, M. A., R. E. Coleman, G. Akabani, N. Niehaus, D. Coleman, and H. K. Lyerly. 1999. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 59:56.

15 26. Tarte, K., S. J. Olsen, Z. Y. Lu, E. Legouffe, J. F. Rossi, Y. Chang, and B. Klein. 1998. Clinical grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 91:1852.

20 27. Tarte, K., Z. Y. Lu, G. Fiol, E. Legouffe, J. F. Rossi, and B. Klein. 1997. Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-CD34 apheresis cells from patients with multiple myeloma. *Blood* 90:3482.

25 28. Zhang, X. G., J. P. Gaillard, N. Robillard, Z. Y. Lu, Z. J. Gu, M. Jourdan, J. M. Boiron, R. Bataille, and B. Klein. 1994. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood*. 83:3654.

30 29. Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- $\gamma$  and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol.* 162:3231.

30. Snijders, A., P. Kalinski, C. M. U. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires 2 signals. *Int. Immunol.* 10:1593.

5 31. Liu, P., M. Rowley, and B. Van Ness. 1996. Wildtype RB and p53 can suppress autocrine IL-6 production and proliferation of U266 myeloma cells. *Blood* 88:389.

10 32. Nazaruk, R. A., R. Rochford, M. V. Hobbs, and M. J. Cannon. 1998. Functional diversity of the CD8+ T-cell response to Epstein-Barr Virus (EBV): Implication for the pathogenesis of EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 91:3875.

15 33. Carter, L. and R. W. Dutton. 1996. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 8:336.

20 34. Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 1999. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634.

25 35. Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 161:2804.

30 36. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747.

37. Rissoan, M-C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183.
- 5 38. Zhou, L. J. and T. F. Tedder. 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* 86:3295.

Tableau I  
Analyse phénotypique des DC

| Milieu              | Cytokines        | Rendement (%) | Viabilité (%) | Moyenne des pourcentages de cellules positives (IMF) |           |         |           |
|---------------------|------------------|---------------|---------------|--|-----------|---------|-----------|
|                     |                  |               |               | CD14   | HLA-DR    | CD83    | CD86      |
| RPMI-FCS            | GM/IL-4          | 9             | 93            | 10 (32)  | 100 (180) | 3       | 80 (72)   |
|                     | GM/IL-4/TNF      | 10            | 94            | 4  | 100 (465) | 86 (47) | 98 (120)  |
|                     | GM/IL-4/TNF/PGE2 | 10            | 95            | 3  | 100 (417) | 94 (65) | 98 (190)  |
| XV-sérum AB         | GM/IL-4          | 12            | 92            | 80 (52)  | 100 (115) | 0       | 77 (32)   |
|                     | GM/IL-4/TNF      | 14            | 90            | 25 (69)  | 100 (224) | 25 (40) | 95 (60)   |
|                     | GM/IL-4/TNF/PGE2 | 13            | 86            | 40 (50)  | 100 (173) | 52 (80) | 90 (60)   |
| XV-plasma autologue | GM/IL-4          | 18            | 90            | 40 (35)  | 100 (90)  | 0       | 25 (39)   |
|                     | GM/IL-4/TNF      | 19            | 95            | 20 (29)  | 100 (125) | 20 (55) | 35 (42)   |
|                     | GM/IL-4/TNF/PGE2 | 23            | 92            | 12 (60)  | 100 (145) | 80 (65) | 80 (58)   |
| XV-sérum autologue  | GM/IL-4          | 22            | 89            | 50 (35)  | 100 (95)  | 9 (12)  | 28 (26)   |
|                     | GM/IL-4/TNF      | 25            | 90            | 26 (66)  | 100 (120) | 17 (25) | 39 (33)   |
|                     | GM/IL-4/TNF/PGE2 | 23            | 93            | 40 (70)  | 100 (115) | 59 (66) | 72 (68)   |
| XV-HA               | GM/IL-4          | 16            | 89            | 21 (13)  | 100 (172) | 0       | 82 (46)   |
|                     | GM/IL-4/TNF      | 16            | 94            | 5  | 100 (270) | 55 (43) | 100 (110) |
|                     | GM/IL-4/TNF/PGE2 | 20            | 90            | 3  | 100 (251) | 85 (66) | 100 (136) |

XV-HA = milieu X-VIVO 15-2 % d'albuminine humaine

GM = facteur GM-CSF

**Tableau II**  
**Analyse phénolytique de DC obtenues par culture dans du milieu**  
**XV-HA complémenté avec GM-CSF, IL-4 et TNF- $\alpha$  avec ou sans PGE2**

5

| Cytokines                 | CD14          | HLA-DR        | CD83          | CD80         | CD86          |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| GM/IL-4/TNF               | 2,6 $\pm$ 8,2 | 100           | 64 $\pm$ 19   | 100          | 100           |
| Moyenne des %*** $\pm$ SD | -             | 299 $\pm$ 183 | 44 $\pm$ 7    | 140 $\pm$ 49 | 251 $\pm$ 211 |
| GM/IL-4/TNF/PGE2          | 1,5 $\pm$ 4   | 100           | 83 $\pm$ 12** | 100          | 100           |
| Moyenne des %*** $\pm$ SD | -             | 265 $\pm$ 124 | 61 $\pm$ 25*  | 190 $\pm$ 85 | 345 $\pm$ 271 |

\* p< 0,01 par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4/TNF

\*\* p< 0,05 par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4/TNF

\*\*\* moyenne des % = moyenne des % de cellules positives

10 GM = facteur GM-CSF

**Tableau III**  
**Profil des récepteurs des DC**

| Conditions de culture   | Moyenne des % de cellules positives (IFM) |           |              |              |
|-------------------------|---|-----------|--------------|--------------|
|                         | MR  | CD36      | $\alpha$ vb3 | $\alpha$ vb5 |
| XV-HA GM/IL-4           | 98 (233)                                  | 88 (89)   | 0            | 87 (43)      |
| XV-HA GM/IL-4/TNF       | 80 (95)*                                  | 37 (47)** | 0            | 68 (32)*     |
| XV-HA GM/IL-4/TNF /PGE2 | 74 (91)*                                  | 25 (33)** | 0            | 58 (36)*     |

5

XV-HA = milieu X-VIVO 15 - 2 % HA

\* p < 0,01 par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4

\*\* p < 0,05 par comparaison aux cellules cultivées avec GM/IL-4

Tableau IV : CCR5

| Conditions de culture | GM+IL-4  | GM+IL-4+TNF | GM+IL-4+TNF+PGE2 |
|-----------------------|----------|-------------|------------------|
| Donneur 1             | 8        | 4           | 3                |
| Donneur 2             | 12       | 6           | 5                |
| Donneur 3             | 14       | 6           | 5                |
| Donneur 4             | 10       | 5           | 5                |
| Donneur 5             | 10       | 4           | 4                |
| Donneur 6             | 11       | 6           | 6                |
| IFM                   | 10,8     | 5,2         | 4,7              |
|                       | p = 0,03 |             | p = 0,25         |

Tableau V  
Production de cytokines par les DC

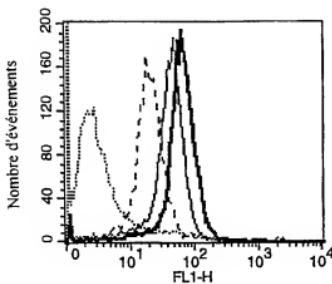
| Conditions de culture  | Production de cytokines (pg/ml) |       |                              |                         |  |                          |
|------------------------|---------------------------------|-------|------------------------------|-------------------------|--|--------------------------|
|                        | sans stimulation                |       | stimulation avec CD40        |                         | stimulation avec CD 40 + IFN- $\gamma$ |                          |
|                        | IL-10                           | IL-12 | IL-10                        | IL-12                   | IL-10                                  | IL-12                    |
| XV-HA GM/IL-4          | 25 $\pm$ 9<br>(16-35)           | 0     | 1619 $\pm$ 529<br>(105-2360) | 5,5 $\pm$ 6,3<br>(0-11) | 50 $\pm$ 57<br>(14-115)                | 158 $\pm$ 274<br>(0-476) |
| XV-HA GM/IL-4/TNF      | 0                               | 0     | 137 $\pm$ 104<br>(62-285)    | 84 $\pm$ 23<br>(55-105) | 7 $\pm$ 7<br>(0-21)                    | 299 $\pm$ 518<br>(0-898) |
| XV-HA GM/IL-4/TNF/PGE2 | 0                               | 0     | 64 $\pm$ 61<br>(0-145)       | 7,2 $\pm$ 8,8<br>(0-18) | 0                                      | 16 $\pm$ 29<br>(0-50)    |

## REVENDICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de cellules dendritiques, caractérisé en ce qu'il 5 consiste :
  - 1) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, des cellules mononucléées issues de cytaphérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une interleukine (IL) bloquant la différentiation vers la voie macrophagique ;
  - 2) à ajouter au milieu de culture du TNF- $\alpha$  et éventuellement un médiateur inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours supplémentaires ;
  - 3) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la culture de l'étape 1) est réalisée pendant 5 jours et celle de l'étape 2) pendant 2 jours ;
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'interleukine est l'interleukine-4 ou l'interleukine-13.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce 20 que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ).
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le médiateur inflammatoire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et la prostaglandine E2 (PGE2).
- 25 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sont des cellules mononucléées obtenues par cytaphérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou par au moins un facteur de croissance cellulaire.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce 30 que le GM-CSF, l'interleukine et le TNF- $\alpha$  sont chacun utilisés à raison de 1 à 1000 ng/ml de milieu.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'albumine humaine est utilisée à raison de 1 à 2 % (poids/volume de milieu).

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'albumine humaine est utilisée à raison de 2 % (poids/volume de milieu).
10. Cellules dendritiques irréversibles caractérisées en ce qu'elles sont  $\alpha\beta3^-$ ,  
5  $\alpha\beta5^+$ , CCR5 $^-$  et CCR7 $^+$ .
11. Utilisation des cellules dendritiques irréversibles  $\alpha\beta3^-$ ,  $\alpha\beta5^+$ , CCR5 $^-$  et  
CCR7 $^+$  pour la préparation d'un agent d'immunothérapie utile pour le  
traitement de toute maladie impliquant le système immunitaire.
12. Procédé de traitement immunothérapeutique, caractérisé en ce qu'il  
10 consiste :
  - 1) à prélever à un patient à traiter des cellules mononucléées par  
cytaphérèse après mobilisation par chimiothérapie et/ou avec un facteur  
de croissance cellulaire et éventuellement congélation/décongélation ;
  - 2) à cultiver, pendant 4 à 6 jours, des cellules mononucléées issues de  
15 cytaphérèse après mobilisation, dans un milieu exempt de sérum  
complémenté avec de l'albumine humaine en présence d'un facteur  
stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et d'une  
interleukine (IL) bloquant la différentiation vers la voie macrophagique ;
  - 3) à ajouter au milieu de culture du TNF- $\alpha$  et éventuellement un médiateur  
inflammatoire et à poursuivre la culture pendant environ 1 à 4 jours  
supplémentaires en les activant par des antigènes spécifiques ;
  - 4) à récupérer les cellules dendritiques ainsi formées et activées.
  - 5) à réinjecter lesdites cellules dendritiques audit patient.
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que lesdites cellules  
20 dendritiques sont congelées/décongelées avant d'être réinjectées audit  
patient.
- 25

## A. GM-CSF + IL-4



## B. GM-CSF + IL-4 + TNF

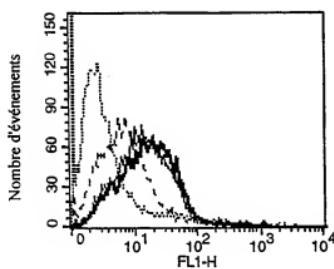
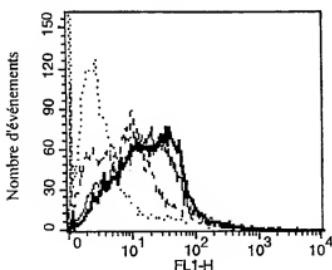


FIG.1

## C. GM-CSF + IL-4 + TNF + PGE2



2/6

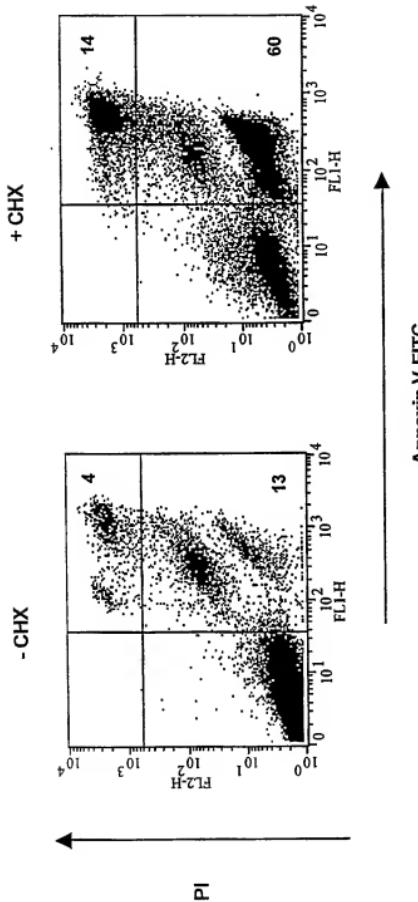


FIG.2

3/6

XG-1 + DC 4°C

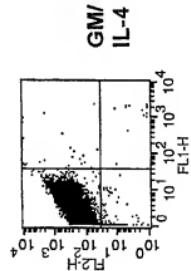
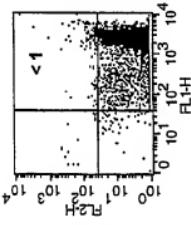
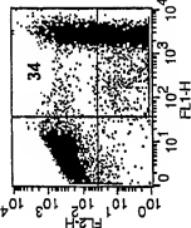
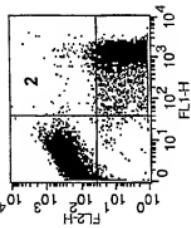
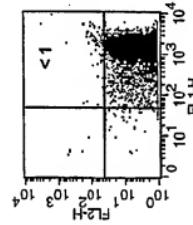
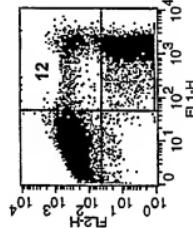
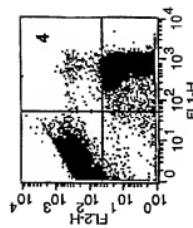
XG-1  
Apoptotiques

FIG.3

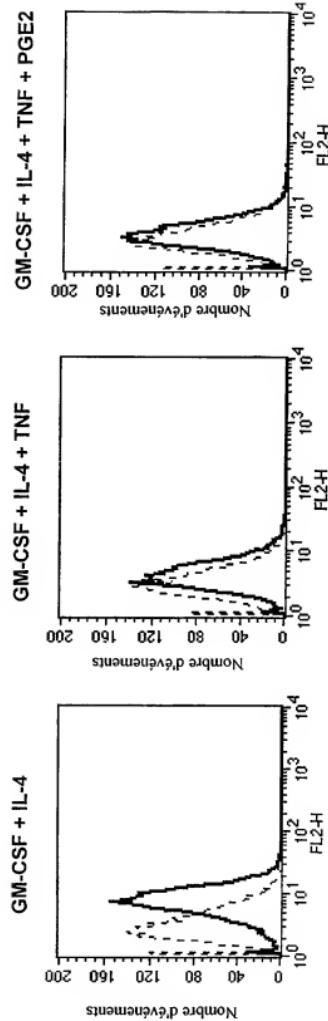
DC

4/6

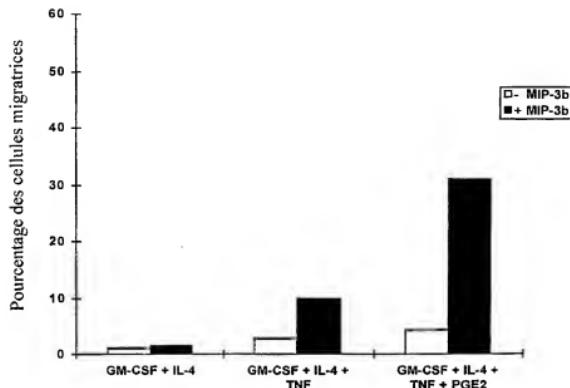
FIG.4

CCR5

A.



A.



B.

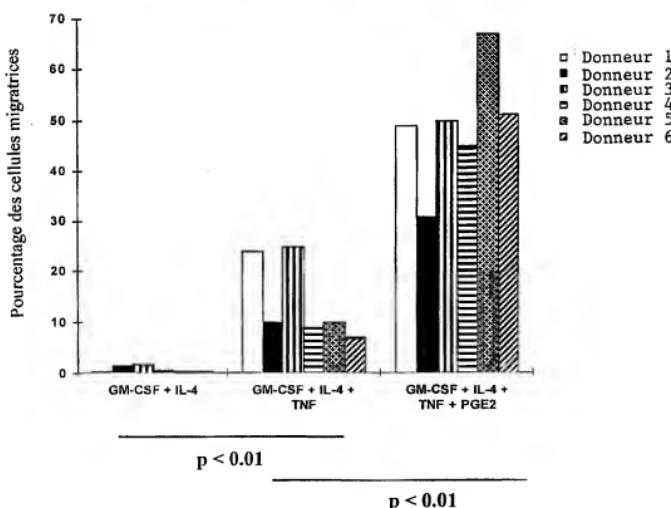


FIG.5

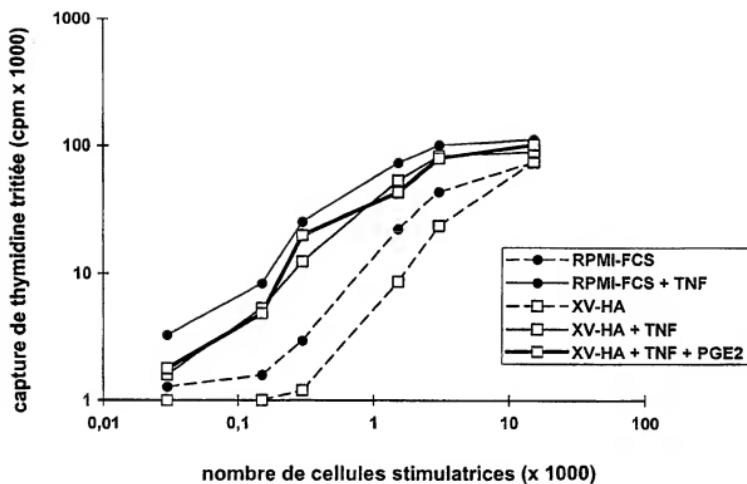


FIG.6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/02173

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X        | TARTE K ET AL: "Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-CD34 apheresis cells from patients with multiple myeloma."<br>BLOOD, (1997) 90 3482-95,<br>XP000906762<br>page 3491, right-hand column, line 22<br>-page 3492, left-hand column, line 16<br>page 3494, left-hand column, line 31 -<br>line 37<br>--- | 1-11                  |
| Y        | ---  | 12,13                 |
| Y        | WO 98 53048 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA)<br>26 November 1998 (1998-11-26)<br>claims 1-53<br>---  | 12,13                 |
|          | -/-  |                       |

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step since the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

21 November 2000

28/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No  
PCT/FR 00/02173

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X        | TARTE K ET AL: "Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." BLOOD, (15 MAR 1998) 91 1852-7,<br>XP000906761<br>page 1852, right-hand column, line 1 - line 13<br>---  | 1-11                  |
| A        | FRESHNEY R.: "Culture of animal cells" 1987 , ALAN R. LISS, INC. , NEW YORK,US<br>XP002136509 154920<br>page 73, left-hand column, line 6 - line 12<br>---   | 8,9                   |
| A        | ALBERT M ET AL: "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphaVbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1998 OCT 15) 188 1359-68,<br>XP000906793<br>abstract<br>---   | 10,11                 |
| A        | SALLUSTO F ET AL: "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 28 2760-9,<br>XP000906788<br>abstract<br>---  | 10,11                 |
| A        | KALINSKI P ET AL: "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+ CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 161 (6) 2804-9,<br>XP002136508<br>abstract<br>----- | 5                     |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

## Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02173

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) |              | Publication date         |
|--|------------------|-------------------------|--------------|--------------------------|
| WO 9853048                             | A 26-11-1998     | AU 7499498 A            | EP 0983345 A | 11-12-1998<br>08-03-2000 |

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Den. de Internationale No  
PCT/FR 00/02173

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
C1B 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/14 A61P37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la loi selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| X           | TARTE K ET AL: "Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-cd34 apheresis cells from patients with multiple myeloma."<br>BLOOD, (1997) 90 3482-95,<br>XP000906762<br>page 3491, colonne de droite, ligne 22<br>-page 3492, colonne de gauche, ligne 16<br>page 3494, colonne de gauche, ligne 31 -<br>ligne 37 | 1-11                          |
| Y           | —   | 12,13                         |
| Y           | WO 98 53048 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA)<br>26 novembre 1998 (1998-11-26)<br>revendications 1-53<br>—   | 12,13                         |
|             | —/—   |                               |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*U\* document pouvant servir d'outil pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5018 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 00/02173

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X         | TARTE K ET AL: "Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." BLOOD, (15 MAR 1998) 91 1852-7,<br>XP000906761<br>page 1852, colonne de droite, ligne 1 -<br>ligne 13<br>---  | 1-11                          |
| A         | FRESHNEY R.: "Culture of animal cells" 1987 , ALAN R. LISS, INC. , NEW YORK,US<br>XP002136509 154920<br>page 73, colonne de gauche, ligne 6 -<br>ligne 12<br>---  | 8,9                           |
| A         | ALBERT M ET AL: "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha <sub>v</sub> beta <sub>5</sub> and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, (1998 OCT 15) 188 1359-68,<br>XP000906793<br>abrégué<br>---  | 10,11                         |
| A         | SALLUSTO F ET AL: "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 28 2760-9,<br>XP000906788<br>abrégué<br>---  | 10,11                         |
| A         | KALINSKI P ET AL: "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+ CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998) 161 (6) 2804-9,<br>XP002136508<br>abrégué<br>--- | 5                             |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document de Internationale No

PCT/FR 00/02173

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) |                        | Date de<br>publication   |
|---|------------------------|---|------------------------|--------------------------|
| WO 9853048 A                                    | 26-11-1998             | AU<br>EP                                | 7499498 A<br>0983345 A | 11-12-1998<br>08-03-2000 |